

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16381

研究課題名(和文) 大動脈弁異所性石灰化の原因細胞の同定とその機序解明及び石灰化抑制薬の開発

研究課題名(英文) Elucidating the original cell and mechanism of aortic valve ectopic calcification and developing new drugs for inhibiting calcification

研究代表者

于 在強 (YU, ZAIQIANG)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：40624268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：高齢社会の進行に伴い、弁異所性石灰化による大動脈弁狭窄症(AVS)患者が増加しているが、弁異所性石灰化の原因細胞やその石灰化の進行を抑制する薬物療法の確立が急務である。我々はAVS患者より単離した大動脈弁間質細胞(HAVICs)の性状解析を行なった。その結果、これらのHAVICsが全て細胞表面マーカーCD73/90/105陽性及びCD45陰性を示した。さらにCD34陽性細胞が陰性細胞へ形質転換して石灰化能を獲得する。また、血管内皮増殖因子受容体(VEGFR2)陽性を示し、内皮間葉移行が弁異所性石灰化に関与することを見出した。その後、黄連解毒湯は弁異所性石灰化の進行を抑制することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VEGFR2陽性細胞は、AVS患者から得た大動脈弁において、内皮だけでなく間質にも多数局在していたため、AVS患者から単離されたHAVICsが大動脈弁内皮細胞に由来し、例えば、内皮間葉移行によるこれらの細胞の分化が大動脈弁の異所性石灰化に寄与する可能性があることを示唆している。これらの結果に基づいて、内皮間葉移行を視野に据えた大動脈弁異所性石灰化のメカニズムを解明し、AVS増悪の主要因である異所性石灰化の進行を抑制するための新しい治療法を開発する必要がある。今後の弁石灰化の機序を解明するとともに、弁石灰化の進行を抑制する薬物治療法の開発には新しい治療ターゲットを提供した重要な意義がある。

研究成果の概要(英文)：Aortic valve stenosis (AVS) is accompanied by irreversible calcification without medical therapy. We recently demonstrated that human aortic valve interstitial cells (HAVICs) obtained from AVS patients were highly sensitive to ectopic calcification stimulation. The immunohistochemical features of HAVICs were analyzed. Cultured P1 HAVICs were CD73-, CD90-, and CD105-positive, and CD45- and CD34-negative. HAVICs were vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)-positive; however, approximately half were -smooth muscle actin (SMA)-positive, colonized, and easily differentiated into osteoblastic cells. Calcified aortic valve immunohistochemistry showed that all cells were positive for VEGFR2 but partly -SMA. VEGFR2-positive cells were more sensitive to tumor necrosis factor- α -induced ectopic calcification. We conclude that HAVICs obtained from patients with AVS are VEGFR2-positive undifferentiated mesenchymal cells and may contribute to aortic valve ectopic calcification.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：大動脈弁石灰化 大動脈弁狭窄症 薬物治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

A. 臨床的背景

・高齢社会の進行に伴い、大動脈弁狭窄症 (Aortic stenosis, AVS) 患者が増加し、弁置換術を含む手術件数も増える一方である。

・弁置換術は人工心肺装置を要し、全在院死亡率が 2.7% であり、かつ侵襲性が高い。生体弁は術後約 15 年で再弁置換術が必要となる。手術不能の患者が約 3 割存在すると言われるが、経カテーテル弁留置術の普及によりいくらか減少の傾向をたどっている。

B. 大動脈弁異所性石灰化機構に関する研究

(1) 動脈硬化原因説

・大動脈弁内膜損傷やバイア障害により、白血球の浸潤と共に炎症性サイトカインが放出され、弁間質細胞の中にある線維芽細胞の骨芽細胞への分化誘導が起こり、弁異所性石灰化が亢進する (Leopold, Circ Cardiovasc Interv. 2012)。

(2) 弁内皮細胞起源説

・大動脈弁恒常性を保つ弁内皮細胞は何らかの刺激によって、骨芽細胞へ分化し、弁石灰化を亢進させる (Leopold, Circ Cardiovasc Interv. 2012)。

(3) 未分化細胞起源説

・ブタ正常大動脈弁に間葉系前駆細胞が局在し、骨芽細胞様細胞への分化能があると報告されていた (Hajdu et al., J Mol Cell Cardiol. 2011)。

・弁内膜損傷に伴い、内皮前駆細胞の機能障害による弁石灰化が亢進する (Matsumoto et al, Eur Heart J. 2009)。

C. 石灰化大動脈弁狭窄症の薬物治療に関する研究

・弁異所性石灰化に対して有効な薬物治療法はないとされている。

・コレステロール合成阻害薬(スタチン)や NO などは AVS の血行動態を改善するが、弁石灰化の進行に対して抑制効果がないと報告されている。

・また、matrix Gla protein (MGP) による骨形成タンパク質(BMP2)活性阻害など異所性石灰化を抑制する生理機構の存在が報告された (Rajamannan et al., Circ Res. 2011)。本研究室でも、MGP の発現亢進による大動脈弁間質細胞 (HAVICs) の石灰化を抑制する (Chiyoya et al., JPHS. 2018)。

以上の背景から、大動脈弁異所性石灰化の原因細胞を同定した上、弁異所性石灰化への薬物治療法の開発が必要があると考えた。

2. 研究の目的

大動脈弁異所性石灰化の原因細胞の同定とその機序解明及び石灰化抑制薬の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 使用試料

・弘前大学医学部倫理委員会の了承の下、術前インフォームドコンセントで同意を得た AVS 患者を対象とした。大動脈弁置換術を受ける AVS 患者より石灰化弁の提供を受けた(7 例)。大動脈弁閉鎖不全症等患者より非石灰化弁の提供を受け、正常大動脈弁切片を作成する(7 例)。

・弁を 1-2mm に切って、酵素処理法によりヒト大動脈弁間質細胞(HAVICs)を単離培養した。

・間葉系未分化細胞(CD73, 90, 105 (+)/45 (-)細胞)は、HAVICs の蛍光活性化セルソーティング(FACS)を用いた細胞選別により得た。

・ CD34 陽性及び陰性細胞、血管内皮増殖受容体 2 (VEGFR2) 陽性及び陰性細胞、平滑筋アクチン (α -SMA) 陽性及び陰性細胞を、再度 FACS を用いた細胞選別に付すことにより得た。

(2) HAVICs や間葉系未分化細胞の石灰化誘発

・ 腫瘍壊死因子(TNF- α , 30 ng/mL)添加、またはリン酸添加(high Pi, 培地内濃度 3.2 mM)後、3 ~ 4 日おきに培地交換し、7 ~ 14 日間継続培養した。

・ 石灰化に影響を与える各種試薬は、石灰化誘発 1 時間前に投与した。

(3) 主な測定

・ 石灰化検出:Alizarin Red S 試薬を用いて検出した。

・ 遺伝子発現:real-time PCR 法を用いた。

・ タンパク質発現:Western blot による免疫染色により定量した。

(4) 弁組織蛍光染色

・ 弁組織を 10 %ホルマリンで固定し、4 μ m の切片を作製した。

・ 各種細胞表面マーカー : CD34/VEGFR2, CD34/ α -SMA, α -SMA/VEGFR2 などの二重蛍光染色を行なった。

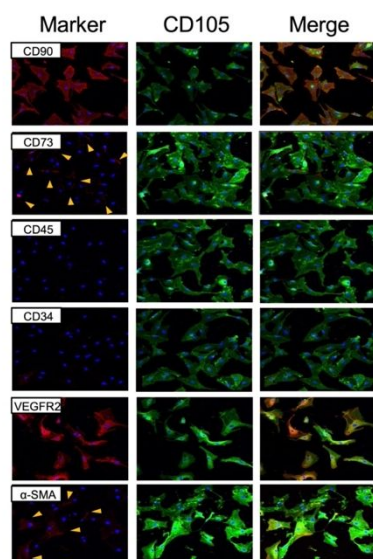
4 . 研究成果

(1) 摘出大動脈弁から得た間質細胞(HAVICs)の多くが間葉系未分化細胞としての特徴を持ち、CD73, 90, 105 (+)/CD45(-)を示した。これらの細胞の中、造血幹細胞マーカーである CD 34 陽性及び陰性細胞が含まれている。さらに、AVS 患者の石灰化弁から得た CD 73, 90, 105 (+)/CD45(-)細胞がほぼ 100%で CD34 陰性細胞であることを確認した。P 1 細胞及び組織切片による二重蛍光染色ではいずれも同様な結果が得られた。

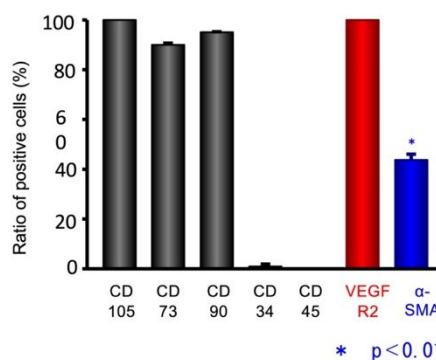
(2) HAVICsの性質を解析したところ、ほぼ全ての細胞が血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR 2) 陽性を示したが、平滑筋アクチン (α -SMA) について約半数 (43.7% \pm 0.8%) の細胞は陽性だった。組織切片による二重蛍光染色でも同様な結果が得られた。また、VEGFR 2 陽性 HAVICsは強い骨化分化能を示した。VEGFR 2 陽性HAVICsは α -SMAの陰陽性に関わらず、石灰化能の差を認めなかったため、 α -SMAが弁石灰化に寄与しない可能性が示唆された (図 1)。

図 1 : 細胞蛍光免疫染色像、すべての細胞が VEGFR 2 陽性、半分の細胞は α -SMA 陽性を示した。

A : 細胞蛍光免疫染色



B : 各種陽性細胞の存在比



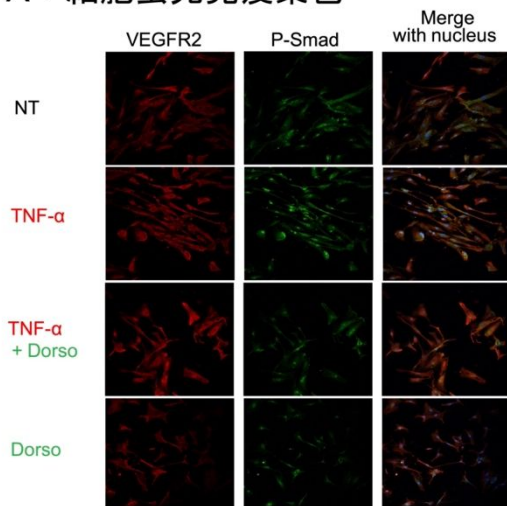
CD 105, 73, 90 : 間葉系幹細胞マーカー
 CD 34, 45 : 造血幹細胞マーカー
 VEGFR2 : 血管内皮細胞マーカー
 α -SMA : 平滑筋、線維芽細胞マーカー

- (3) VEGFR 2 陽性 HAVICs は腫瘍壊死因子 (TNF- α) 誘発性石灰化に対して反応性を調べた。TNF- の刺激を加え、6 時間経過してから、VEGFR 2 陽性 HAVICs において Smad1/5/8 のリン酸化は有意に亢進した。VEGFR 2 陽性 HAVICs は TNF- 反応性が高いと考えられた。
- (4) VEGFR 2 陽性 HAVICs の TNF- 誘発性石灰化において、骨形成因子 (BMP 2) の発現亢進とアルカリホスファターゼ (ALP) の活性上昇を認めた。また、NF- κ B ファミリーの転写因子である p65 のリン酸化も亢進しており、TNF- は NF- κ B 経路を介して VEGFR 2 陽性 HAVICs の石灰化を誘発することを明らかにした (図 2)。
- (5) 大動脈弁由来の HAVICs の TNF- や高リン酸誘発性石灰化に対して抑制効果のある漢方薬や化合物について、スクリーニングを施行した。その結果、漢方薬である黄連解毒湯は 10-30 μ g/ml のドーズで TNF- や高リン酸誘発性石灰化を有意に抑制した。また、BMP2 の発現亢進と ALP 活性の上昇を有意に抑制した。黄連解毒湯の構成生薬であるオウレン、オウゴン、オウバクそれぞれ単独でも黄連解毒湯と同様な抑制効果を認めた。臨床では、大動脈弁石灰化の薬物治療法の確立には重要な発見と考えられた。

今後の研究について大動脈弁石灰化に関わる原因細胞の内皮間葉移行による形質転換の機序を解明しながら、弁石灰化の進行を抑制する薬物治療法を確立する必要がある。

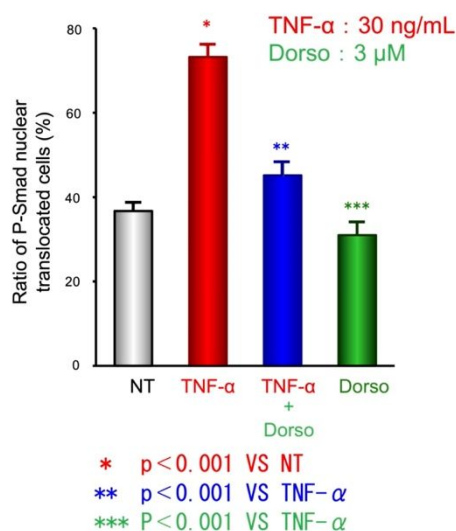
図 2 : TNF- 刺激により、P-SMD 陽性細胞が増加した。これらの変化は Dorosomorphin に抑制されたため、TNF- は NF- κ B 経路を介して VEGFR 2 陽性 HAVICs の石灰化を誘発した。

A : 細胞蛍光免疫染色



Dorsomorphin (Dorso): Smad1/5/8 リン酸化抑制薬

B : P-Smad 陽性細胞の存在比



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yu Z, Seya K, Chiyoya M, Daitoku K, Motomura S, Imaizumi T, Fukuda I, Furukawa KI	4. 巻 37
2. 論文標題 Warfarin calcifies human aortic valve interstitial cells at high phosphate conditions via pregnane X receptor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 944-956
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-019-01001-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Zaiqiang YU, Kazuyuki Daitoku, Fukuda Ikuo, Kazuhiko Seya
2. 発表標題 CD34 negative mesenchymal stem cell has higher calcific activity by decreasing tenascin-X gene expression
3. 学会等名 The Heart Valve Society annual meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 于 在強、大徳 和之、瀬谷 和彦、福田 幾夫
2. 発表標題 黄連解毒湯の大動脈弁石灰化の抑制作用：大動脈弁間質細胞を用いた検討
3. 学会等名 日本心臓血管外科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------